ChinaXiv合作期刊

·论著·

“通督调神”电针预处理介导 miR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D 信号通路对脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质线粒体通透性转换孔的影响及机制探讨

张国庆[1]，童婷婷[2]，王颖[1]，李奎武[2]，张利达[3]，吴晓晴[2]，李成龙[2]，汪俊丽[2]，张君宇[4]，韩为[1*]

【摘要】 背景 缺血性脑卒中发病率、死亡率、致残率均较高，溶栓后的再灌注损伤对患者影响较大，针刺是治疗本病的特色疗法，但作用机制尚不明确。目的 探讨“通督调神”电针预处理对脑缺血再灌注损伤（CIRI）大鼠 miR-124-3p/糖原合成酶激酶β（GSK-3β）/亲环素 D（Cyp-D）信号通路及线粒体膜通透性转换孔（MPTP）的影响，探讨其防治 CIRI 的可能机制。方法 2022 年 6—8 月，将 100 只清洁级 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、电针组、抑制剂组和电针 + 激动剂组，每组 20 只。造模前干预 7 d，电针组、电针 + 激动剂组选取通督调神穴组：百会、风府、大椎穴进行电针干预，1 次 /d，连续 7 d；造模前 24 h 电针 + 激动剂组和抑制剂组分别侧脑室注射 miR-124 激动剂和抑制剂（5 nmol）。除假手术组，余组采用改良线栓法制备大鼠右侧脑缺血再灌注模型；造模成功后，取大鼠右侧脑皮质，采用改良神经功能损伤评分量表（mNSS）、TTC 染色观察各组大鼠神经功能损伤程度，TUNEL 染色以及透射电镜观察神经细胞损伤情况；免疫荧光染色、Western blotting、实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠脑皮质 GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D、细胞色素 C（Cyt-C）、Caspase-3 表达。结果 除假手术组，各组大鼠均造模成功。与假手术组比较，模型组大鼠 mNSS 评分及脑组织相对梗死体积均增加，线粒体结构破坏严重，细胞凋亡指数升高，p-GSK-3β、Cyp-D 阳性表达分别减弱和增强，miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达增高，p-GSK-3β/GSK-3β 值降低，Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 蛋白相对表达量增高，MPTP 开放程度增加（$P<0.05$）。与模型组比较，电针组、抑制剂组 mNSS 评分及相对梗死体积均降低，线粒体结构破坏减轻，p-GSK-3β/GSK-3β 增加，Caspase-3 蛋白相对表达量降低；电针 + 激动剂组 GSK-3β mRNA 表达增高（$P<0.05$）；电针组、抑制剂组、电针 + 激动剂组细胞凋亡指数降低，p-GSK-3β、Cyp-D 阳性表达分别减弱和增强，miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达降低，Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量降低，MPTP 开放程度降低（$P<0.05$）。与电针组比较，抑制剂组 p-GSK-3β 阳性表达增强，Cyp-D 阳性表达减弱，miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达降低，GSK-3β mRNA 表达增高，Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量降低，MPTP 开放程度降低（$P<0.05$）；电针 + 激动剂组细胞凋亡指数增高，p-GSK-3β 阳性表达减弱，Cyp-D 阳性表达增强，miR-124-3p、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达增高，Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量增高，MPTP 开放程度增加（$P<0.05$）。结论 “通督调神”电针预处理可减轻 CIRI 大鼠神经损伤，其机制可能与介导 miR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D 信号通路、抑制线粒体 MPTP 开放进而减轻细胞损伤相关。这一研究结果从机制上进一步验证了“通督调神”针法治疗 CIRI 的疗效，同时为中医“治未病”提供新的科学依据，促进临床应用。

【关键词】 再灌注损伤；脑缺血；卒中；线粒体通透性转换孔；通督调神；电针疗法；miR-124-3p；穴，百会；穴，风府；穴，大椎

【中图分类号】 R 619.9 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2023.0056

张国庆，童婷婷，王颖，等．“通督调神”电针预处理介导 miR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D 信号通路对脑缺血再灌注损伤大鼠脑皮质线粒体通透性转换孔的影响及机制探讨［J］．中国全科医学，2023．［Epub ahead of print］．［www.chinagp.net］

ZHANG G Q，TONG T T，WANG Y，et al. Effect and mechanism of tongdu tiaoshen electroacupuncture pretreatment-mediated MiR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D signaling pathway on mitochondrial permeability transition pore in cerebral cortex of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury［J］. Chinese General Practice，2023.［Epub ahead of print］.

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81973933）——通督调神针刺调节 miR-124 促进脑缺血再灌注损伤神经保护的机制研究；安徽省第十三批 115 产业创新团队“针药结合防治脑病创新团队”项目（皖人才办［2020］4 号）；安徽省名中医王颖工作室建设项目（中发展［2022］5 号）

1.230061 安徽省合肥市，安徽中医药大学第二附属医院脑病科 2.230061 安徽省合肥市，安徽中医药大学第二临床医学院 3.510370 广东省广州市，广州医科大学附属脑科医院中医科 4.230061 安徽省合肥市，安徽中医药大学第二附属医院老年病科

*通信作者：韩为，主任医师 / 博士生导师；E-mail：13956060099@139.com

本文数字出版日期：2023-03-27

chinaXiv:202303.10317v1

ChinaXiv合作期刊

Effect and Mechanism of Tongdu Tiaoshen Electroacupuncture Pretreatment-mediated MiR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D Signaling Pathway on Mitochondrial Permeability Transition Pore in Cerebral Cortex of Rats with Cerebral Ischemia-reperfusion Injury

ZHANG Guoqing[1], *TONG Tingting*[2], *WANG Ying*[1], *LI Kuiwu*[2], *ZHANG Lida*[3], *WU Xiaoqing*[2], *LI Chenglong*[2], *WANG Junli*[2], *ZHANG Junyu*[4], *HAN Wei*[1*]

1.Department of Encephalopathy, the Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China

2.The Second Clinical Medical College, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China

3.Department of TCM, Brain Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510370, China

4.Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, China

[*]Corresponding author: HAN Wei, Chief physician/Doctoral supervisor; E-mail: 13956060099@139.com

【Abstract】 **Background** The incidence, mortality and disability rates of ischemic stroke are high, and the reperfusion injury after thrombolytic therapy has a great impact on patients. Acupuncture is a characteristic therapy for the treatment of the disease, but the action mechanism remains unclear. Objective To observe the effect of Tongdu Tiaoshen electroacupuncture (EA) pretreatment on miR-124-3p/glycogen synthase kinase β (GSK-3β)/cyclin D (Cyp-D) signaling pathway and mitochondrial permeability transition pore of cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) rats, and explore its possible mechanism of prevention and control of CIRI. Methods June to August 2022, a total of 100 clean SD rats were randomly divided into the sham operation group, model group, EA group, agonist group and EA + inhibitor group, with 20 rats in each group. For 7 d of intervention before modeling, in the EA group and EA + inhibitor group, "Baihui" (GV 20), "Fengfu" (GV 16) and "Dazhui" (GV 14) were selected to perform electroacupuncture 1 time a day for 7 days. For 24 h before modeling, miR-124 agonist and inhibitor (5 nmol) were injected into the lateral ventricles in the EA + agonist group and inhibitor group. Except for the sham operation group, the right cerebral ischemia-reperfusion model of rats was prepared by the modified suture method in the rest groups. The right cerebral cortex of rats was taken, the degree of neurological impairment in each group was observed using mNSS scale and TTC staining, the nerve cell injury was observed by TUNEL staining and transmission electron microscopy. The expressions of GSK-3β, p-GSK-3β, Cyp-D, Cyt-C and Caspase-3 in cerebral cortex of each group were detected by immunofluorescence staining, Western blot and real-time quantitative PCR. Results Except for the sham operation group, all rest groups of rats were successfully modeled. Compared with the sham operation group, mNSS score and infarct volume of brain tissue were increased, mitochondrial structure was seriously damaged, cell apoptosis index was increased, p-GSK-3β positive expression was reduced, Cyp-D positive expression was enhanced, miR-124-3p, Cyp-D, Cyt-C and Caspase-3 mRNA expressions were increased, p-GSK-3β/ GSK-3β ratio was decreased, relative Cyp-D, Cyt-C, and Caspase-3 protein expressions were increased, and MPTP openness degree was increased in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, mNSS score and relative infarct volume were decreased, mitochondrial structure destruction was relieved, p-GSK-3β/GSK-3β ratio was increased, and relative expression of Caspase-3 protein was decreased in the electroacupuncture group and inhibitor group; the mRNA expression of GSK-3β was increased in electroacupuncture + agonist group ($P<0.05$); apoptosis index was decreased, positive expression of p-GSK-3β was reduced and positive expression of Cyp-D was enhanced respectively, miR-124-3p, Cyp-D, Cyt-C and Caspase-3 mRNA expressions were decreased, Cyp-D and Cyt-C protein expressions were decreased, the degree of MPTP openness was decreased in the electroacupuncture group, inhibitor group and electroacupuncture + agonist group ($P<0.05$). Compared with the electroacupuncture group, p-GSK-3β positive expression was enhanced, Cyp-D positive expression was reduced, miR-124-3p and Cyp-D, Cyt-C, Caspase-3 mRNA expressions were decreased, GSK-3β mRNA expression was increased, Cyp-D and Cyt-C protein expressions were decreased, and MPTP openness degree was reduced in the agonist group ($P<0.05$); the apoptosis index was increased, the positive expression of P-GSK-3β was reduced, the positive expression of Cyp-D was enhanced, the expressions of miR-124-3p, Cyt-C and Caspase-3 mRNA were increased, the expressions of Cyp-D and Cyt-C protein were increased, and the openness degree of MPTP was increased in the electroacupuncture + agonist group ($P<0.05$). Conclusion Tongdu Tiaoshen electroacupuncture pretreatment can alleviate neurological impairment in cerebral ischemia-reperfusion rats, the mechanism may be related to mediating miR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D signaling pathway, inhibiting MPTP openness and thus reducing cell injury. The results of this study further verified the therapeutic effect of Tongdu Tiaoshen electroacupuncture in the treatment of CIRI from the mechanism, providing a new scientific basis for preventive treatment of disease of TCM and promote its clinical application.

【Key words】 Reperfusion injury; Brain ischemia; Stroke; Mitochondrial permeability transition pore; Tongdu Tiaoshen; Electroacupuncture therapy; miR-124-3p; Point GV20 (Baihui); Point GV16 (Fengfu); Point GV14 (Dazhui)

chinaXiv:202303.10317v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10317v1

脑卒中是人类致死和致残的主要疾病之一[1]，其中，缺血性脑卒中的发生率约为 87%[2]。目前国际公认的急性期脑卒中的有效治疗手段是尽早溶栓、恢复血流[3]，然而恢复缺血区血流会不可避免地加重缺血性脑损伤，引起脑缺血再灌注损伤（CIRI）[4]。研究发现，电针预处理对 CIRI 具有抑制炎性反应、调节自噬、抗氧化应激等作用[5-6]。然而，有关电针防治 CIRI 的作用机制尚未能完全明晰，有待进一步研究。

CIRI 的病理过程较为复杂，线粒体作为细胞的动力源在细胞能量稳态中起着关键作用[7]，线粒体功能障碍是器官再灌注损伤发生后诱发机体损伤的重要因素[8-9]。因此，靶向线粒体可能是缺血性卒中的重要防治策略之一[10]。线粒体通透性转换孔（MPTP）开放是线粒体功能障碍以及诱发神经元凋亡级联反应的关键环节[11]。亲环素 D（Cyp-D）是调控 MPTP 的关键蛋白，当 MPTP 异常开放后，线粒体内膜上细胞色素 C（Cyt-C）等被释放入细胞质中，进而激活凋亡相关蛋白，诱发细胞凋亡[12]。

微小 RNA 在调节多种细胞功能中发挥重要作用，其中 miR-124 特异性表达于中枢神经系统[13]。研究显示，miR-124 的异常表达与脑损伤密切相关[14]，且 miR-124 与糖原合成酶激酶 -3β（GSK-3β）mRNA 之间可能存在靶向关系[15]。GSK-3β 可以通过直接调节 MPTP，维持线粒体功能[16]。电针预处理对 CIRI 的神经保护作用是否与 miR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D 信号通路介导的 MPTP 开放度降低相关，值得关注。

本研究通过观察“通督调神”电针预处理对 CIRI 大鼠缺血侧脑皮质神经元线粒体 MPTP 的影响，探讨电针预处理对 CIRI 大鼠的潜在神经保护机制，为促进“通督调神”针刺法对缺血性脑卒中的临床应用提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 100 只，鼠龄 7 周，体质量 200~250 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司〔清洁级，许可证号：SCXK（湘）2019-0004〕，饲养于安徽中医药大学实验动物中心。饲养条件：Ⅱ级，温度（23±2）℃，相对湿度（60%±10）%，自由摄食饮水，12 h/12 h 明暗周期。适应性饲养 1 周后，采用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、电针组、抑制剂组与电针 + 激动剂组，每组 20 只。本次实验过程中对大鼠的处置符合国家科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》中的相关规定，并取得安徽中医药大学伦理委员会批准（伦理编号：AHUCM-rats-2021012）。

1.2 主要试剂与仪器 小鼠抗大鼠甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（GAPDH）抗体（TA-08）、山羊抗小鼠 IgG（HRP，ZB-2305）、山羊抗兔 IgG（HRP，ZB-2301）均购于北京 Zsbio 公司。糖原合酶激酶 3β（GSK3β）抗体（BS1402）、p-GSK3β 抗体（BS4084）购于美国 Bioworld 公司，亲环蛋白 D（Cyp-D）抗体（ABP52875）购于瑞士 Abbkin 公司，细胞色素 C（Cyt C）抗体（BA0781）购于美国 Boster 公司，半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 -3（Caspase-3）抗体（ab184787）购于英国 abcam 公司；PCR 引物（上海 Sangon Biotech 公司）；TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（B014）、山羊抗兔 IgG（FITC，B029）购于安徽欣乐生物技术有限公司；兔抗大鼠 Cyp-D 抗体（bs-9878R）购于北京博奥森生物技术有限公司，兔抗大鼠 GSK3β 抗体（BS1402）、兔抗大鼠 P-GSK3β 抗体（BS4084）购于美国 Bioworld 公司；线粒体通透性转换孔（MPTP）检测试剂盒（C2009S）购于上海碧云天生物技术有限公司。miR-124-3p 激动剂（ISO9001）、miR-124-3p 抑制剂（ISO13485），购于广州市锐博生物科技有限公司。

天协牌一次性无菌针灸针（0.3 mm×25.0 mm，苏州天协针灸器械有限公司），华佗牌电子针疗仪（SDZ-Ⅱ，苏州医疗用品厂有限公司），电子天平（FA2004N，上海菁海仪器有限公司），荧光显微镜（BX51，日本 Olympus 公司），徕卡切片机（RM2016，德国 Leica 公司），荧光定量 PCR 仪（PIKOREAL 96，美国 Thermo Scientific），流式细胞仪（CytoFLEX，上海贝克曼库尔特国际贸易有限公司），动物麻醉机（R500/R600 系列，深圳瑞沃德生命科技有限公司），Image J 图像分析软件（美国 NIH 公司），全自动数字切片扫描系统（Pannoramic MIDI，匈牙利 3DHISTECH 公司），形态学图像分析系统（JD801，江苏省捷达科技发展有限公司）。

1.3 干预方法 造模前干预 7 d：（1）假手术组与模型组大鼠常规饲养，同电针组做相同的抓取、捆绑，但不做任何干预。（2）电针组大鼠在干预期内吸入异氟烷麻醉状态下，抓取、捆绑，俯卧位固定于鼠板上。选取通督调神穴组：百会、风府、大椎穴进行干预，取 0.20×25.0 mm 毫针，在针柄处连接电针治疗仪，以针体轻轻抖动为度，选用疏密波，频率为 2 Hz/5 Hz，电流强度 1~2 mA，1 次 /d，20 min/ 次，连续干预 7 d。穴区定位及针刺方法：百会，顶骨的正中央，向后斜刺 3 mm；风府，枕骨顶脊后枕寰关节背凹陷处，平刺进针 3 mm；大椎，第 7 颈椎与第 1 胸椎间，背部正中，向后斜刺 3 mm。穴位定位参照《实验针灸学》[17]关于“常用实验动物针灸穴位”的取穴标准。（3）抑制剂组大鼠在干预期内前期常规饲养，同电针组做相同的抓取、捆绑。大鼠于造模前 24 h 经侧脑室注射 miR-124-3p 抑制剂 10 μl（0.5 nmol/μl）。侧脑室注射：大鼠

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10317v1

腹腔注射 2 % 戊巴比妥钠溶液（30 mg/kg）麻醉后俯卧位固定于脑立体定位仪上，备皮后用 2% 复方聚维酮碘溶液消毒，沿头部正中作一长 0.5~1.0 mm 的纵向切口，暴露颅骨后用棉签蘸取 3% 过氧化氢溶液涂擦颅骨表面，记号笔标记前囟点。以前囟为基点，调整进针点坐标位置（ 前囟后：0.8 mm，距矢状缝横向距离：1.5 mm，进针深度：4.5 mm）。用牙科钻 （孔径约 2 mm） 钻开颅骨至硬脑膜，使用微量注射器进入硬膜下 4.5 mm 的侧脑室位置后连接脑立体定位仪，以 0.5 μl/min 的速度向脑室内注射 miR-124 抑制剂，注射完毕后留针 5~10 min，以防药液外渗，结束后缓慢退出注射器，干棉球轻微按压针孔，消毒后逐层缝合头皮。（4）电针 + 激动剂组大鼠在干预期内与电针组同期进行相同的电针干预，并且于造模前 24 h 经侧脑室注射 miR-124-3p 激动剂 10 μl（0.5 nmol/μl）。

1.4　模型制备　末次电针及侧脑室注射 24 h 后，参照有关文献[18]采用改良线栓法制备 CIRI 大鼠模型。大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液（30 mg/kg）麻醉后仰卧位固定于鼠板上、备皮，2% 复方聚维酮碘溶液消毒，于颈前正中偏右 0.2~0.3 cm 皮肤行一长 1.5~2.0 cm 纵行切口，镊子钝性分离皮下筋膜，暴露胸锁乳突肌，在颈前肌群与胸锁乳突肌与之间向深部钝性分离，暴露颈动脉鞘，玻璃分针游离颈总动脉（CCA）和迷走神经，向上分离直至 CCA 分叉处。钝性分离颈外动脉（ECA）和颈内动脉（ICA），使之清晰可见。结扎距离 ICA、ECA 分叉处下 7~10 mm 的 CCA 近心端，同时在 CCA 距离 ICA、ECA 分叉处下 3 mm 的 CCA 远心端打一活结备用。结扎 ECA 近心端，动脉微血管夹夹闭 ICA。在活结下 2 mm 处用显微剪在 CCA 上剪一“V”型切口，插入直径 0.3 mm 的硅胶线栓，沿 ICA 方向插入后去除血管夹，从 ICA、ECA 分叉处继续插入 18~20 mm，至线栓遇轻微阻力时停止并结扎 CCA 上的活结。2% 复方聚维酮碘溶液消毒后逐层缝合切口，将线栓尾端留置在体外，用 0.9% 的氯化钠溶液浸湿的棉球覆盖伤口，腹腔注射青霉素钠溶液 0.2 ml/d（4×10^4 U/d）预防感染。

模型组、电针组、电针 + 激动剂组及抑制剂组均按上述方法造模；假手术组大鼠只分离右侧颈部 CCA、ICA、ECA，不进行结扎和插线；模型大鼠脑缺血 2 h 后，回抽线栓令头端退至 CCA 结扎处，恢复大脑中动脉灌注。

再灌注 2 h 后依据 Zea-Longa5 分法对大鼠进行神经功能缺损评分[19]，0 分：无神经功能损伤症状；1 分：不能完全伸展对侧前肢，提尾悬吊时左前肢屈曲；2 分：爬行时向对侧转圈；3 分：爬行时向对侧倾倒；4 分：意识水平下降或丧失，不能自主行走。1~3 分视为造模成功，纳入实验。各组大鼠均造模成功。

1.5　取材及指标检测

1.5.1　行为学检测　采用改良神经功能损伤评分量表（mNSS）[20]评定各组大鼠 CIRI 模型制备完成 24 h 后神经行为学情况。mNSS 评分总分为 0~18 分。分数越高，代表神经功能损伤越严重。

1.5.2　组织取材　神经功能损伤评分结束后大鼠腹腔注 2% 戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉。每组随机选取 15 只大鼠，迅速断头，取出全脑组织。每组取 5 只大鼠全脑用冰 0.9% 氯化钠溶液冲洗，冰箱速冻，用于 TTC 染色。每组取 4 只大鼠迅速打开胸腔暴露心脏，用 0.9% 氯化钠溶液进行灌注后取脑，分离右侧皮质组织，将其修整成 2 份大小为 1 mm×1 mm×1 mm 的组织样本，一份置于电镜固定液内室温固定 24 h，于 4 ℃冰箱保存以行透射电镜观察，另一份用于制备单细胞悬液，以行流式细胞检测。每组取 6 只大鼠断头后取右侧脑皮质组织迅速装入冻存管置于液氮罐中低温保存，用于实时荧光定量 PCR、Western blotting 检测。每组剩余的 5 只大鼠迅速打开胸腔，暴露心脏后依次予以 0.9% 氯化钠溶液及 4% 多聚甲醛灌注，结束后于冰上断头分离出全脑组织，置于 4% 多聚甲醛中固定 24~48 h，用于 TUNEL 染色和免疫荧光染色。

1.5.3　TTC 染色法观察各组大鼠脑组织梗死情况　取 -20 ℃冰箱冷冻 20 min 的脑组织，去除小脑及嗅球部分后，切成 5 个厚度约 2 mm 的冠状切片，将脑片置于 2%TTC 溶液中，37 ℃恒温避光染色，30 min 后取出脑片，置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后拍照。最后使用 Image J 软件进行分析并计算大鼠的相对脑梗死体积，用百分比（%）表示。相对脑梗死体积 = 脑切片白色缺血区域体积 / 脑切片总体积 ×100%。

1.5.4　透射电镜法观察各组大鼠脑皮质神经元超微结构　取电镜固定液固定后的皮质组织，以 1% 的锇酸 ×0.1 mmol/L 磷酸缓冲液 PB 于室温固定 2 h 后漂洗，15 min×3 次。梯度乙醇脱水，丙酮渗透、包埋，制成超薄切片（厚度 70 nm），铀铅双染色各 15 min，室温干燥过夜，将切片置于透射电镜下 ×10 000、×25 000 观察神经细胞超微结构。

1.5.5　实时荧光定量 PCR 法检测大鼠脑皮质 miR-124-3p 及 GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达　取脑皮质组织 100 mg，按试剂盒说明，经过总 RNA 抽提、反转录成 cDNA 样本后进行荧光定量 PCR 扩增。反应结束后根据测得样品 CT 值，以 U6、β-actin 为内参，按照 2-ΔΔCT 计算目的基因的 miRNA 及 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司提供，引物序列见表 1 。

1.5.6　Western blotting 检测大鼠脑皮质 GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 蛋白表达　取脑皮质组织 100 mg，裂解、离心取上清液、测定蛋白

ChinaXiv合作期刊

表1 目的基因及内参基因的引物序列
Table 1 Primer sequence of target gene and internal reference gene

基因名称	扩增长度（bp）	上游引物（5'→3'）	下游引物（5'→3'）
β-actin	150	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTC
U6	94	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT
Cyp-D	101	ATCCTTAGCAAGTGTCTCGG	CTGGTCAAGGAAAAAGGCAG
GSK-3β	113	ACTTTGGAAGTGCAAAGCAG	ACTAGACGTGTAATCGGTGG
Cyt-C	86	TAAGACTGGACCAAACCTCC	TGTTCTTGTTGGCATCTGTG
Caspase-3	138	ATGTCGATGCAGCTAACCTC	AACTGCTCCTTTTGCTGTGA
miR-124-3p	64	ACACTCCAGCTGGGTAAGGCACGCGGTG	TGGTGTCGTGGAGTCG
miR-124-3p-RT		CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGCATT	

浓度、加热使蛋白充分变性后，依次经过电泳、转膜、封闭，漂洗，加入一抗，过夜，PBST漂洗3遍，加入二抗，室温孵育2 h，PBST漂洗10 min，重复3遍。使用ECL发光试剂盒检测蛋白，Image J处理分析灰度值，以GAPDH为内参蛋白，计算目标蛋白相对表达量，目的蛋白相对表达量=目的条带灰度值/内参条带灰度值。

1.5.7 流式细胞检测线粒体通透性转换孔开放程度 取出脑皮质组织加入1 ml混合消化液，剪碎组织后37 ℃恒温箱中振荡消化，过滤后收集单细胞悬液，加入适当体积的检测缓冲液、Calcein AM染色液、荧光淬灭工作液或Ionomycin对照重悬，37 ℃避光孵育30 min后，1 000×g室温离心5 min收集细胞，加入400 μl检测缓冲液重悬细胞后进行流式细胞仪检测和分析。Calcein的最大激发光波长为494 nm，最大发射光波长为517 nm。

1.5.8 TUNEL染色法检测大鼠脑皮质神经细胞凋亡情况 将固定后的脑组织石蜡包埋、切片（厚度5 μm）。切片依次经过烤片、浸洗、脱腊、洗片，滴加蛋白酶K工作液37 ℃孵育25 min后PBS冲洗3次，滴加Tunel检测液，37 ℃培养箱孵育60 min，PBS冲洗3次，滴加DAPI染液，避光反应10 min。PBS清洗后甩干，抗荧光淬灭封片剂封片。数字切片扫描仪（Pannoramic MIDI）扫描荧光切片，CaseViewer 2.2软件 ×400观察并记录图像。每只大鼠随机选取2张切片，每张切片随机截取3个视野，用Image J软件计算凋亡指数（apoptosis index，AI），公式为AI（%）=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

1.5.9 免疫荧光法检测大鼠脑皮质GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D的表达 将标本从组织固定液中取出，依次进行脱水、浸蜡、包埋、切片（厚度5 μm）后浸洗及脱腊，抗原高压修复，山羊血清封闭，室温孵育30 min后滴加一抗，37 ℃孵育1 h，PBS冲洗，甩干，滴加FITC标记的荧光二抗，37 ℃避光孵育30 min，PBS冲洗后封片，数字切片扫描仪（Pannoramic MIDI）扫描荧光切片，CaseViewer 2.2软件 ×400观察并记录图像。每只大鼠随机选取2张切片，每张切片随机取3个视野，捷达JD801医学图像分析系统进行图像分析，计算平均光密度值。

1.6 统计学方法 采用SPSS 26.0软件进行数据处理和分析，采用GraphPad Prism 8.0整理生成统计图。符合正态分布的计量资料数据以（$\bar{x} \pm s$）表示，Shapiro-Wilk法检验各指标数据的正态性，Leven检验数据方差齐性。数据符合正态分布且方差齐时，多组间均数比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t法，方差不齐时多重比较采用盖姆斯-豪厄尔检验。不符合正态分布的计量资料以M（P_{25}，P_{75}）表示，多组间比较采用独立样本克鲁斯卡尔-沃利斯检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠mNSS评分及脑组织梗死情况比较 各组大鼠mNSS评分和相对梗死体积比较，差异均有统计学意义（$P<0.01$）。假手术组大鼠脑组织无梗死，神经功能无缺损；与假手术组比较，模型组大鼠mNSS评分升高、相对梗死体积增大，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与模型组比较，电针组、抑制剂组大鼠mNSS评分降低、相对梗死体积减小，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与电针组比较，电针+激动剂组大鼠mNSS评分升高、相对梗死体积增大，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图1、表2。

2.2 各组大鼠脑皮质神经细胞超微结构比较 假手术组大鼠脑皮质神经细胞轮廓清晰，细胞核膜完整无皱缩，线粒体形态多呈椭圆形或梭形，大小适中，结构完整，膜边界清晰，嵴纵行排列密集有规律，横纹排列清晰有序，未出现肿胀及空泡；模型组和电针+激动剂组大鼠的神经细胞体积缩小，核膜皱缩，线粒体肿胀，线粒体膜边界不清，嵴断裂稀疏，横纹大部分消失，体内大部分呈空泡状态；电针组和抑制剂组大鼠细胞轮廓尚清晰，细胞核膜轻度皱缩，线粒体呈椭圆或梭形，略肿胀，结构完整，膜尚清晰，嵴和横纹分布基本整齐有序，见图2。

2.3 各组大鼠脑皮质神经细胞凋亡情况 各组大鼠脑

chinaXiv:202303.10317v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10317v1

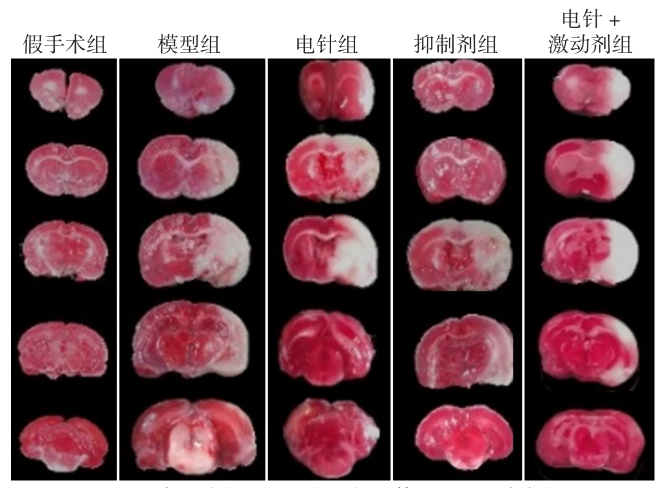


图 1 各组大鼠脑组织相对梗死体积（TTC 染色）

Figure 1 Relative infarct volume of brain tissue of rats in each group

表 2 各组大鼠 mNSS 评分及脑组织相对梗死体积比较

Table 2 Comparison of mNSS score and infarct volume of brain tissue of rats in each group

组别	只数	mNSS 评分〔$M(P_{25}, P_{50})$，分〕	只数	脑组织相对梗死体积（$\bar{x} \pm s$，%）
假手术组	20	0（0，0）	5	0.00
模型组	20	10（10，11）[a]	5	0.35 ± 0.04[a]
电针组	20	6（6，7）[b]	5	0.22 ± 0.04[b]
抑制剂组	20	6（5.25，7）[b]	5	0.18 ± 0.02[b]
电针 + 激动剂组	20	10（9，10）[c]	5	0.31 ± 0.02[c]
F（*H*）值		86.638		135.041[e]
P 值		<0.001		<0.001

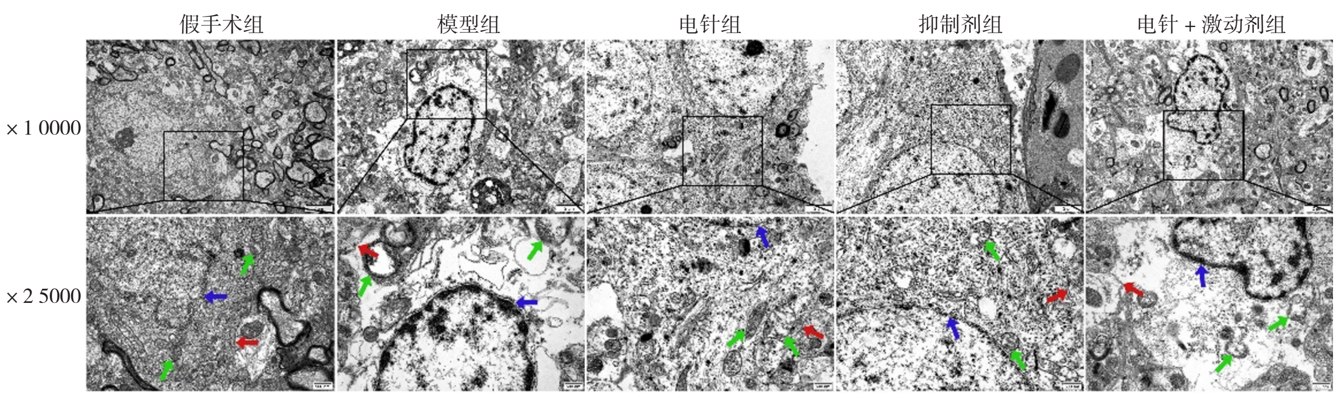
注：[a] 表示与假手术组比较 *P*<0.05，[b] 表示与模型组比较 *P*<0.05，[c] 表示与电针组比较 *P*<0.05，[e] 为 *H* 值

皮质细胞凋亡指数比较，差异均有统计学意义（*P*<0.05）。与假手术组比较，模型组大鼠脑皮质细胞凋亡指数升高（*P*<0.01）；与模型组比较，电针组、抑制剂组、电针 + 激动剂组大鼠脑皮质细胞凋亡指数降低（*P*<0.01）；与电针组比较，抑制剂组大鼠脑皮质细胞凋亡指数降低，电针 + 激动剂组细胞凋亡指数增高（*P*<0.05），见图 3、表 3。

2.4 各组大鼠脑皮质 GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D 蛋白表达情况 各组 GSK-3β 蛋白阳性表达结果比较，差异无统计学意义（*P*>0.05）。各组 p-GSK-3β 蛋白阳性表达结果比较，差异有统计学意义（*P*<0.05）。与假手术组比较，模型组 p-GSK-3β 蛋白阳性表达减弱，Cyp-D 蛋白阳性表达增强，差异有统计学意义（*P*<0.01）；与模型组比较，电针组、抑制剂组、电针 + 激动剂组 p-GSK-3β 蛋白阳性表达增强，Cyp-D 蛋白阳性表达减弱，差异有统计学意义（*P*<0.01）；与电针组比较，抑制剂组 p-GSK-3β 蛋白阳性表达增强，Cyp-D 蛋白阳性表达减弱，电针 + 激动剂组 p-GSK-3β 蛋白阳性表达减弱，Cyp-D 蛋白阳性表达增强，差异有统计学意义（*P*<0.05），见图 4、表 3。

2.5 各组大鼠脑皮质 miR-124-3p 及 GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达比较 各组大鼠脑皮质 miR-124-3p 及 GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达比较，差异均有统计学意义（*P*<0.05）。与假手术组比较，模型组大鼠脑皮质 miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达增高，GSK-3β mRNA 表达降低，差异有统计学意义（*P*<0.01）；与模型组比较，电针组、抑制剂组、电针 + 激动剂组 miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达降低，电针组、抑制剂组 GSK-3β mRNA 表达增高，电针 + 激动剂组 GSK-3β mRNA 表达增高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；与电针组比较，抑制剂组 miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达降低，GSK-3β mRNA 表达增高，差异有统计学意义（*P*<0.05），电针 + 激动剂组 miR-124-3p、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达增高，差异有统计学意义（*P*<0.05），见表 4。

2.6 各组大鼠脑皮质 p-GSK-3β/GSK-3β、Cyp-D、

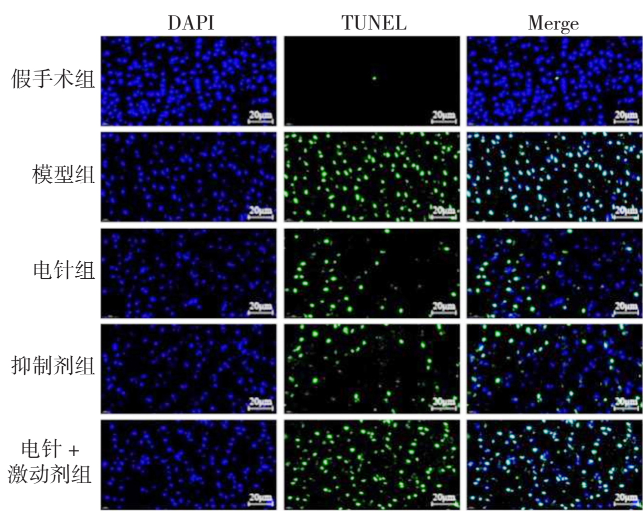


注：图中红色箭头所示细胞膜，蓝色箭头所示细胞核，绿色箭头所示线粒体

图 2 各组大鼠脑皮质神经细胞超微结构（透射电镜）

Figure 2 Ultrastructure of neurons in cerebral cortex of rats in each group

ChinaXiv合作期刊



注：蓝色荧光标记细胞核（DAPI），绿色荧光为 TUNEL 阳性细胞

图 3　各组大鼠脑皮质神经细胞凋亡情况（TUNEL 染色，×400）

Figure 3　Apoptosis of neurons in cerebral cortex of rats in each group

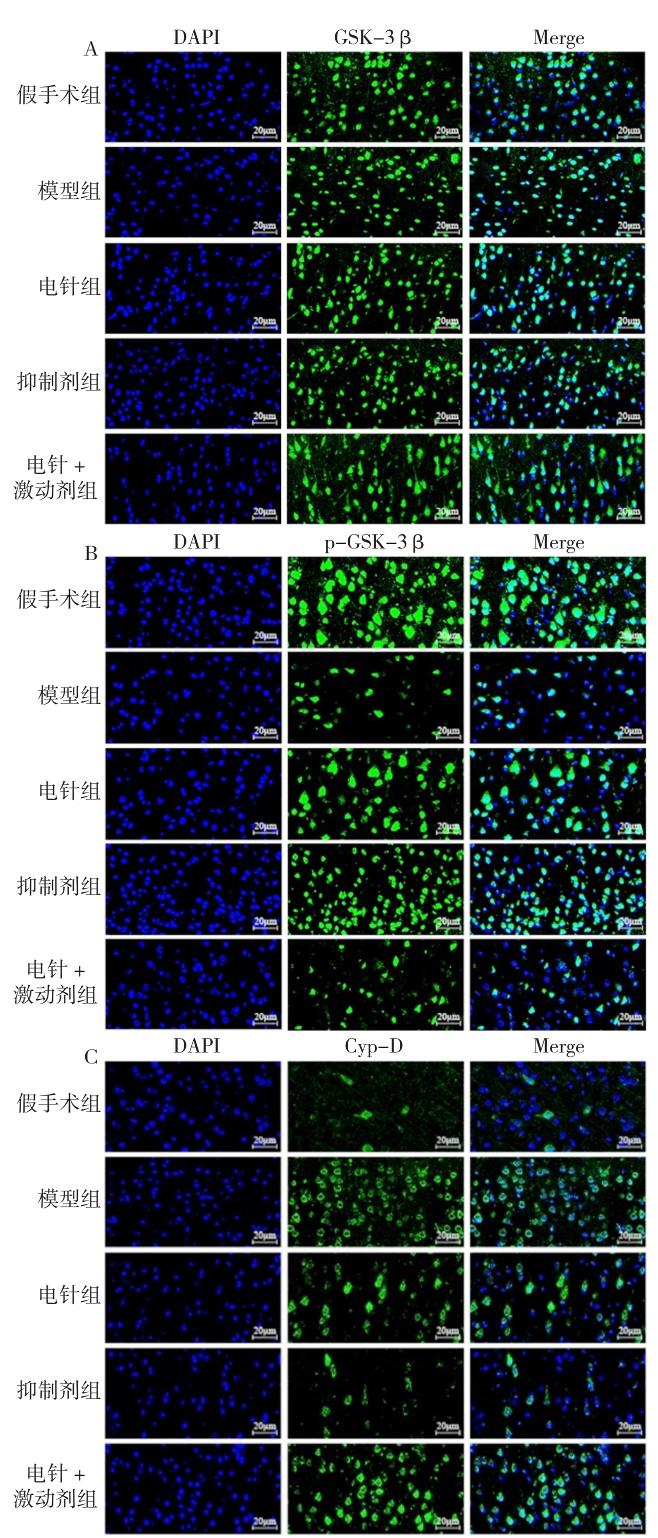
表 3　各组大鼠脑皮质 GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D 蛋白阳性表达及 Tunel 细胞凋亡指数比较（$\bar{x}\pm s$，n=5）

Table 3　Comparison of GSK-3β，p-GSK-3β，Cyp-D protein positive expression and apoptosis index of Tunel cells in cerebral cortex of rats in each group

组别	只数	TUNEL	GSK-3β	p-GSK-3β	Cyp-D
假手术组	5	0.16±0.02	0.59±0.02	0.61±0.03	0.14±0.01
模型组	5	0.60±0.03[a]	0.60±0.04	0.16±0.02[a]	0.61±0.04[a]
电针组	5	0.37±0.02[b]	0.59±0.02	0.37±0.04[b]	0.37±0.02[b]
抑制剂组	5	0.29±0.02[bc]	0.59±0.01	0.50±0.03[bc]	0.28±0.02[bc]
电针＋激动剂组	5	0.41±0.03[bd]	0.60±0.05	0.27±0.03[bc]	0.46±0.04[bc]
F 值		251.206	0.205	157.005	193.968
P 值		<0.001	0.932	<0.001	<0.001

注：[a] 表示与假手术组比较 P<0.01，[b] 表示与模型组比较 P<0.01，[c] 表示与电针组比较 P<0.05

Cyt-C、Caspase-3 蛋白表达比较　各组大鼠脑皮质 p-GSK-3β/GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 蛋白表达比较，差异均有统计学意义（P<0.05）。与假手术组比较，模型组大鼠脑皮质 p-GSK-3β/GSK-3β 值降低，Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 蛋白相对表达量增高（P<0.01）；与模型组比较，电针组、抑制剂组 p-GSK-3β/GSK-3β 值增高，Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量降低（P<0.01），Caspase-3 蛋白相对表达量降低（P<0.01、P<0.05）；电针＋激动剂组 Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量降低（P<0.01），p-GSK-3β/GSK-3β 值增高、Caspase-3 蛋白相对表达量降低，差异均无统计学意义（P>0.05）。与电针组比较，抑制剂组 Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量降低（P<0.01）；电针＋激动剂组 Cyp-D、Cyt-C 蛋白相对表达量增高（P<0.01），p-GSK-3β/GSK-3β 值降低，Caspase-3 蛋白相对表达量增高，差异均无统计学意义（P>0.05），见图 5。



注：蓝色荧光标记细胞核（DAPI），绿色荧光分别标记 GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D 表达，Merge 为合图；A 为 GSK-3β，B 为 p-GSK-3β，C 为 Cyp-D

图 4　各组大鼠脑皮质 GSK-3β、p-GSK-3β、Cyp-D 表达情况（免疫荧光染色）

Figure 4　Expression of GSK-3β，p-GSK-3β and Cyp-D in cerebral cortex of rats in each group

2.7　各组大鼠脑皮质神经元细胞线粒体 MPTP 的开放程度比较　与假手术组比较，模型组线粒体 MPTP 开放

chinaXiv:202303.10317v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10317v1

表 4 各组大鼠脑皮质 miR-124-3p 及 GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 mRNA 表达比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 4 Comparison of miR-124-3p，GSK-3β，Cyp-D，Cyt-C，Caspase-3 mRNA expressions in cerebral cortex of rats in each group

组别	只数	miR-124-3p	GSK-3β	Cyp-D	Cyt-C	Caspase-3
假手术组	6	1.00±0.05	1.02±0.03	0.91±0.14	0.97±0.08	0.98±0.05
模型组	6	1.94±0.10[a]	0.48±0.11[a]	2.32±0.11[a]	2.78±0.04[a]	1.92±0.11[a]
电针组	6	1.32±0.05[b]	0.79±0.08[b]	1.88±0.24[b]	2.09±0.14[b]	1.38±0.03[b]
抑制剂组	6	0.16±0.01[bc]	0.94±0.05[bc]	1.40±0.16[bc]	1.59±0.05[bc]	1.24±0.05[bc]
电针+激动剂组	6	1.46±0.06[bc]	0.68±0.05[c]	2.06±0.08[b]	2.42±0.05[bc]	1.59±0.08[bc]
F 值		664.668	57.980	78.919	487.748	162.193
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 表示与假手术组比较 P<0.05，b 表示与模型组比较 P<0.05，c 表示与电针组比较 P<0.05

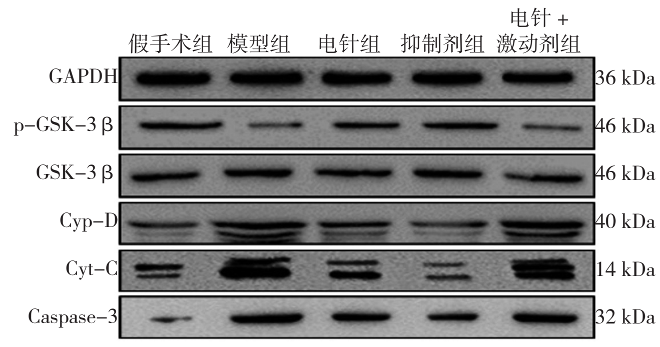


图 5 各组大鼠脑皮质 p-GSK-3β/GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 蛋白表达比较

Figure 5 Comparison of p-GSK-3β/GSK-3β protein expression ratio and GSK-3β，Cyp-D，Cyt-C，Caspase-3 protein expressions in cerebral cortex of rats in each group

表 5 各组大鼠脑皮质 p-GSK-3β/GSK-3β、Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 5 Comparison of p-GSK-3β/GSK-3β protein expression ratio and GSK-3β，Cyp-D，Cyt-C，Caspase-3 protein expressions in cerebral cortex of rats in each group

组别	只数	p-GSK-3β/GSK-3β	Cyp-D	Cyt-C	Caspase-3
假手术组	6	0.95±0.18	0.25±0.06	0.08±0.05	0.10±0.02
模型组	6	0.37±0.13[a]	0.95±0.12[a]	0.82±0.10[a]	0.79±0.14[a]
电针组	6	0.62±0.13[b]	0.51±0.09[b]	0.43±0.12[b]	0.46±0.13[c]
抑制剂组	6	0.73±0.10[b]	0.36±0.03[bc]	0.10±0.06[bc]	0.31±0.08[b]
电针+激动剂组	6	0.47±0.11	0.75±0.11[bc]	0.60±0.09[bc]	0.62±0.09
F 值		17.343	65.481	80.363	41.303
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 表示与假手术组比较 P<0.01，b 表示与模型组比较 P<0.05，c 表示与电针组比较 P<0.05

程度明显增加（P<0.01）；与模型组比较，电针组、抑制剂组、电针+激动剂组线粒体 MPTP 开放程度降低（P<0.01）；与电针组比较，抑制剂组线粒体 MPTP 开放程度降低（P<0.05）、电针+激动剂组线粒体 MPTP 开放程度增加（P<0.05），见图 6、表 6。

表 6 各组大鼠脑皮质神经细胞线粒体通透性转换孔开放程度比较（$\bar{x}\pm s$，n=4）

Table 6 Comparison of openness degree of MPTP in cerebral cortex neurons of rats in each group

组别	只数	MPTP 阳性细胞率（%）
假手术组	4	20.575±2.085
模型组	4	0.865±0.207[a]
电针组	4	6.753±0.076[b]
抑制剂组	4	16.350±0.493[bc]
电针+激动剂组	4	2.690±0.338[bc]
F 值		313.385
P 值		<0.001

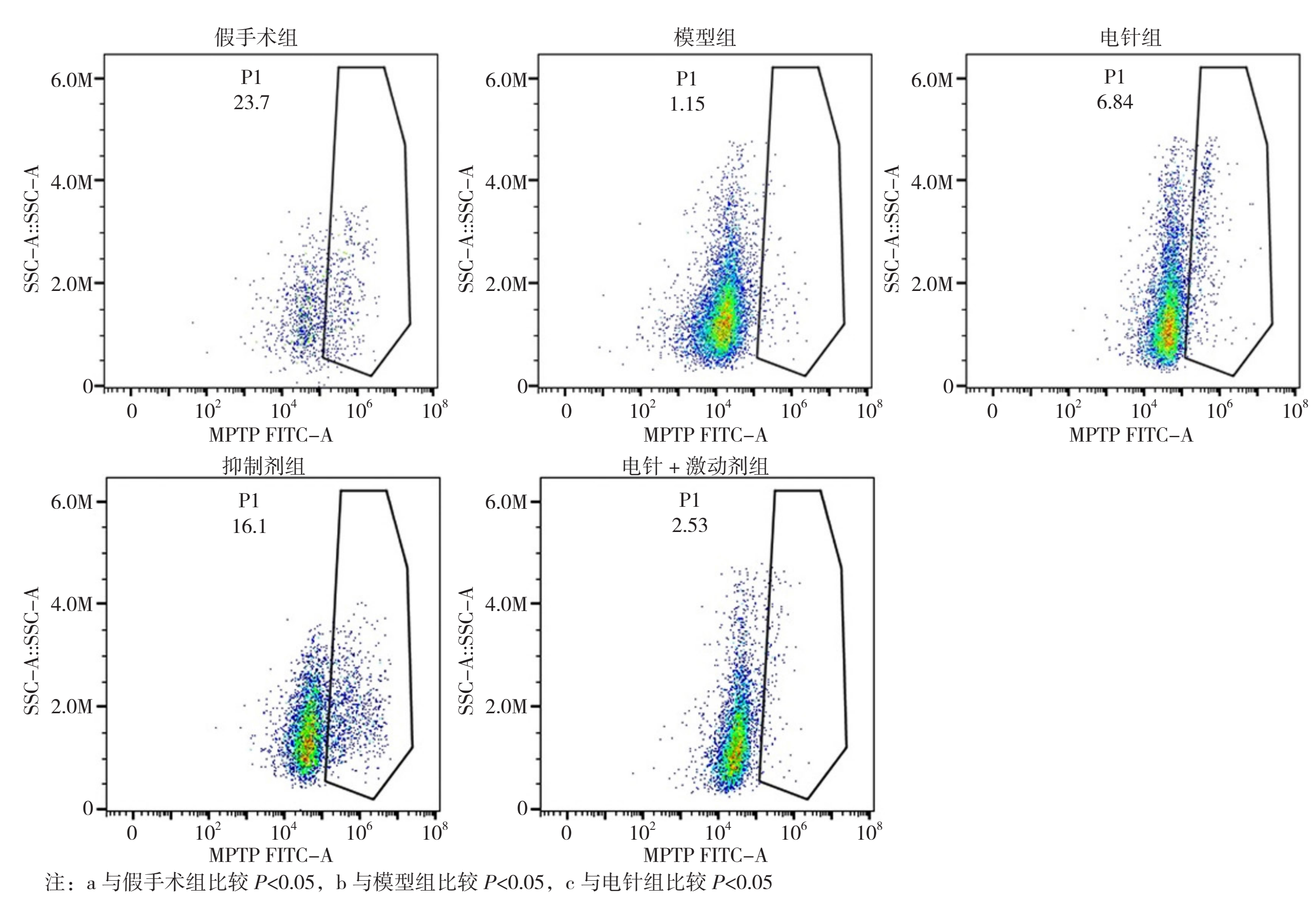
注：a 表示与假手术组比较 P<0.05，b 表示与模型组比较 P<0.05，c 表示与电针组比较 P<0.05

3 讨论

本研究采用“通督调神”电针预处理 CIRI 模型大鼠，选穴百会、风府、大椎。百会乃“三阳五会”，聚一身之阳气汇于巅顶；大椎为“诸阳之会”，具有保健强身之效；风府可“醒脑调神”，三穴均为督脉之要穴，共用有通督调神、燮理阴阳之功[21-22]。研究表明，“通督调神”针刺能够促进神经髓鞘再生、调节细胞自噬，改善 CIRI 后大鼠神经功能，但其更为具体的作用机制尚未明晰[23-24]。因此，探讨“通督调神”电针预处理减轻 CIRI 作用机制，对于本病的防治意义重大。本研究中，CIRI 模型大鼠神经功能损伤评分增高、相对梗死体积增大、TUNEL 阳性细胞率增高；电针预处理后，大鼠神经功能损伤评分及梗死体积减少、TUNEL 阳性细胞率明显降低，表明“通督调神”电针预处理可抑制 CIRI 的发生和发展，减轻神经功能损伤，与相关研究[25-26]结果一致。

细胞凋亡是 CIRI 的一种细胞死亡方式[27]，而线粒体功能障碍介导细胞凋亡的内源性途径，并发挥中心调控作用[28]。MPTP 位于线粒体内外膜之间的接触点上，对调控线粒体通透性起关键作用[29]，当 MPTP 过度开放时，线粒体与细胞质之间的离子交换异常，导致线粒体结构和功能异常[30]。线粒体内膜上 Cyt-C 释放到细胞质中，并进一步活化 Caspase-3 等凋亡相关因子，诱发凋亡发生、加重神经损伤。本研究透射电镜显示

ChinaXiv合作期刊



注：a 与假手术组比较 $P<0.05$，b 与模型组比较 $P<0.05$，c 与电针组比较 $P<0.05$

图 6 各组大鼠脑皮质神经细胞线粒体通透性转换孔开放程度比较（流式细胞技术，4 只鼠 / 组）

Figure 6 Comparison of openness degree of MPTP in cerebral cortex neurons of rats in each group

CIRI 大鼠线粒体形态破坏严重，流式细胞术结果显示 MPTP 开放程度升高；电针组线粒体结构尚完整，MPTP 开放程度降低，提示电针预处理对 CIRI 后的神经保护作用可能与抑制 MPTP 开放、进而保护线粒体功能有关。

miR-124 是参与缺血再灌注损伤发生机制的重要调控因子[31]。李杰等[32]研究发现，采用冲击波干预脑梗死大鼠可降低海马组织 miR-124 表达，促进神经干细胞增殖，改善受损神经功能。研究发现，miR-124 表达下调可增强 GSK-3β 的表达，减弱 Wnt/β-catenin 途径的活性，发挥保护性作用[33]。GSK-3β 是一种在体内广泛表达的的信号转导激酶，参与细胞的多种生理过程，如代谢、凋亡和免疫调节等[34]。目前，已有研究发现 GSK-3β 信号传导通路与调控 MPTP 开放有关[35]，其磷酸化产物 p-GSK-3β 在 CIRI 中的神经保护作用已被证实，即通过抑制 MPTP 的开放来维持线粒体再灌注损伤后的跨膜电位[36]。Cyp-D 是构成 MPTP 最关键的调节蛋白，也是参与神经元缺血性死亡的重要物质[37]。Cyt-C、Caspase-3 是重要的促凋亡蛋白[38]，Caspase-3 被认为是细胞凋亡的标志[39]。

本研究中，模型组大鼠脑皮质 mRNA-124-3p 表达升高、GSK-3β mRNA、p-GSK-3β/GSK-3β 蛋白表达比值降低、Cyp-D 蛋白及 mRNA 表达增高，电针和抑制剂干预后 mRNA-124-3p 表达降低、GSK-3β mRNA、p-GSK-3β/GSK-3β 蛋白表达比值增高、Cyp-D 蛋白及 mRNA 表达降低，说明 mRNA-124 被抑制后可靶向激活 GSK-3β，进而通过上调磷酸化 GSK-3β 的表达，从而抑制 Cyp-D 介导的 MPTP 开放，起到保护线粒体的作用。与模型组比较，电针组和抑制剂组 Cyt-C、Caspase-3 蛋白及 mRNA 表达降低，说明细胞凋亡得到抑制、细胞功能相对稳定。该结果进一步验证电针预处理可能通过负向调控大鼠神经细胞 mRNA-124-3p、进而抑制 MPTP 开放发挥神经保护作用。

为了进一步验证“通督调神”电针预处理对 CIRI 大鼠神经细胞线粒体 MPTP 的影响是否与 miR-124-3p/GSK-3β/Cyp-D 信号通路相关，本研究设置了 miR-124-3p 抑制剂组和电针 + 激动剂组。结果显示，抑制剂组 miR-124-3p 及 Cyp-D、Cyt-C、Caspase-3 表达降低，GSK-3β 表达增高，总体结果与电针组趋同，而电针与 miR-124-3p 激动剂联用后，其抑制 miR-124-3p、进而激活 GSK-3β 抑制 MPTP 开放的作用被逆转。进一步说明“通督调神”电针预处理对 CIRI 大鼠神经功能损伤发生发展的抑制作用，可能是通过调控 miR-

chinaXiv:202303.10317v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10317v1

124-3p/GSK-3β/Cyp-D 信号通路，抑制神经细胞线粒体 MPTP 开放。课题组前期研究[40-41]发现，“通督调神”针刺法对中风高危因素的干预可有效控制“中风先兆”的进展，本研究对今后开展针灸预处理防治缺血性脑卒中的临床应用具有积极的促进作用。然而，电针预处理预防 CIRI 的作用机制复杂，仍有待进一步深入研究。本研究中大鼠为吸入异氟烷麻醉状态下电针，麻醉药对大鼠神经系统的影响是否影响到本实验尚未得知，这使得本实验存在一定的局限性和不足，后续研究将通过查阅文献、实体实验等方式优化电针方式，减少干预因素。

作者贡献：张国庆、童婷婷、李奎武提出研究构思与实验设计，负责实验实施，观察指标的测量与数据收集；张国庆、童婷婷负责撰写论文初稿；李奎武负责统计学分析，吴晓晴、汪俊丽负责数据收集与统计结果审核；张利达、张君宇负责整体实验评估，观察指标的数据收集；韩为、王颖负责文章的质量控制及审校，对文章整体进行监督管理；所有作者确认了论文终稿。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] HE Z，NING N Y，ZHOU Q X，et al. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke［J］. Free Radic Biol Med，2020，146：45-58. DOI：10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005.

[2] LAPCHAK P A，ZHANG J H. The high cost of stroke and stroke cytoprotection research［J］. Transl Stroke Res，2017，8（4）：307-317. DOI：10.1007/s12975-016-0518-y.

[3] POWERS W J，RABINSTEIN A A，ACKERSON T，et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke：2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke：a guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association［J］. Stroke，2019，50（12）：e344-e418. DOI：10.1161/STR.0000000000000211.

[4] GUO P P，JIN Z，WU H S，et al. Effects of irisin on the dysfunction of blood-brain barrier in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion［J］. Brain Behav，2019，9（10）：e01425. DOI：10.1002/brb3.1425.

[5] TIAN W Q，ZHU M M，ZHOU Y D，et al. Electroacupuncture pretreatment alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating mitophagy via mTOR-ULK1/FUNDC1 axis in rats［J］. J Stroke Cerebrovasc Dis，2022，31（1）：106202. DOI：10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.106202.

[6] LONG M，WANG Z G，ZHENG D，et al. Electroacupuncture pretreatment elicits neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats associated with transient receptor potential vanilloid 1-mediated anti-oxidant stress and anti-inflammation［J］. Inflammation，2019，42（5）：1777-1787. DOI：10.1007/s10753-019-01040-y.

[7] HE Z，NING N Y，ZHOU Q X，et al. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke［J］. Free Radic Biol Med，2020，146：45-58. DOI：10.1016/j.freeradbiomed.2019.11.005.

[8] LI S Q，ZHOU Y，GU X C，et al. NLRX1/FUNDC1/NIPSNAP1-2 axis regulates mitophagy and alleviates intestinal ischaemia/reperfusion injury［J］. Cell Prolif，2021，54（3）：e12986. DOI：10.1111/cpr.12986.

[9] ANZELL A R，MAIZY R，PRZYKLENK K，et al. Mitochondrial quality control and disease：insights into ischemia-reperfusion injury［J］. Mol Neurobiol，2018，55（3）：2547-2564. DOI：10.1007/s12035-017-0503-9.

[10] HUANG J L，MANAENKO A，YE Z H，et al. Hypoxia therapy—a new hope for the treatment of mitochondrial dysfunctions［J］. Med Gas Res，2016，6（3）：174-176. DOI：10.4103/2045-9912.191365.

[11] REN Z L，WANG C D，WANG T，et al. Ganoderma lucidum extract ameliorates MPTP-induced Parkinsonism and protects dopaminergic neurons from oxidative stress via regulating mitochondrial function，autophagy，and apoptosis［J］. Acta Pharmacol Sin，2019，40（4）：441-450. DOI：10.1038/s41401-018-0077-8.

[12] YANG H，LI R Z，ZHANG L，et al. p53-cyclophilin D mediates renal tubular cell apoptosis in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury［J］. Am J Physiol Renal Physiol，2019，317（5）：F1311-F1317. DOI：10.1152/ajprenal.00072.2019.

[13] LIU X R，LI F，ZHAO S F，et al. MicroRNA-124-mediated regulation of inhibitory member of apoptosis-stimulating protein of p53 family in experimental stroke［J］. Stroke，2013，44（7）：1973-1980. DOI：10.1161/STROKEAHA.111.000613.

[14] MIAO W，YAN Y，BAO T H，et al. Ischemic postconditioning exerts neuroprotective effect through negatively regulating PI3K/Akt2 signaling pathway by microRNA-124［J］. Biomedecine Pharmacother，2020，126：109786. DOI：10.1016/j.biopha.2019.109786.

[15] TANG S L，HUANG Q H，WU L G，et al. MiR-124 regulates osteoblast differentiation through GSK-3β in ankylosing spondylitis［J］. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22（20）：6616-6624. DOI：10.26355/eurrev_201810_16136.

[16] YANG K，CHEN Z X，GAO J J，et al. The key roles of GSK-3β in regulating mitochondrial activity［J］. Cell Physiol Biochem，2017，44（4）：1445-1459. DOI：10.1159/000485580.

[17] 余曙光，徐斌. 实验针灸学［M］. 3 版. 北京：人民卫生出版社，2021.

[18] 包新杰，赵浩，魏俊吉，等. 线栓法建立大鼠局灶性脑缺血模型的改进［J］. 中国脑血管病杂志，2011，8（5）：248-252. DOI：10.3969/j.issn.1672-5921.2011.05.006.

[19] LONGA E Z，WEINSTEIN P R，CARLSON S，et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats［J］. Stroke，1989，20（1）：84-91. DOI：10.1161/01.str.20.1.84.

[20] XIN J H，MA X X，CHEN W Y，et al. Regulation of blood-brain barrier permeability by Salvinorin A via alleviating endoplasmic reticulum stress in brain endothelial cell after ischemia stroke［J］. Neurochem Int，2021，149：105093. DOI：10.1016/j.neuint.2021.105093.

[21] 郑仕平，韩为，储浩然，等. 通督调神针灸预处理对脑缺血再灌注大鼠相关微小 RNA 调控机制的研究［J］. 针刺研究，2015，40（2）：99-103. DOI：10.13702/j.1000-0607.2015.02.003.

ChinaXiv合作期刊

[22] 彭静，陈曦."补肾通督，醒脑益智"法电针治疗血管性痴呆 80 例[J]. 中国针灸，2022，42（6）：623-624. DOI：10.13703/j.0255-2930.20210413-0005.
PENG J，CHEN X. Bushen Tongdu and Xingnao Yizhi electroacupuncture for 80 cases of vascular dementia[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion，2022，42（6）：623-624. DOI：10.13703/j.0255-2930.20210413-0005.

[23] 刘燕，王陈妮，兰崴，等. 通督调神针刺对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能及 VEGF、NGF、MBP 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志，2022，28（2）：218-223. DOI：10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2022.02.020.

[24] 谷诗浓，刘毓佳，王振杰，等. 基于细胞自噬探讨通督调神针法对缺血再灌注大鼠神经功能及 Beclin-1 蛋白表达的影响[J]. 针灸临床杂志，2020，36（10）：64-68.

[25] 黄亚光，杨松柏，杜利鹏，等. 电针预处理通过调控皮层区自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. 针刺研究，2019，44（12）：867-872. DOI：10.13702/j.1000-0607.190307.

[26] ZHANG G F，YANG P，YIN Z，et al. Electroacupuncture preconditioning protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury via suppression of dynamin-related protein 1[J]. Neural Regen Res，2018，13（1）：86-93. DOI：10.4103/1673-5374.224373.

[27] JIN Z，GUO P P，LI X Y，et al. Neuroprotective effects of irisin against cerebral ischemia/reperfusion injury via Notch signaling pathway[J]. Biomedecine Pharmacother，2019，120：109452. DOI：10.1016/j.biopha.2019.109452.

[28] BOCK F J，TAIT S W G. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2020，21（2）：85-100. DOI：10.1038/s41580-019-0173-8.

[29] BONORA M，GIORGI C，PINTON P. Molecular mechanisms and consequences of mitochondrial permeability transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol，2022，23（4）：266-285. DOI：10.1038/s41580-021-00433-y.

[30] MORCIANO G，NAUMOVA N，KOPROWSKI P，et al. The mitochondrial permeability transition pore：an evolving concept critical for cell life and death[J]. Biol Rev Camb Philos Soc，2021，96（6）：2489-2521. DOI：10.1111/brv.12764.

[31] LIU K，YAN L H，JIANG X J，et al. Acquired inhibition of microRNA-124 protects against spinal cord ischemia-reperfusion injury partially through a mitophagy-dependent pathway[J]. J Thorac Cardiovasc Surg，2017，154（5）：1498-1508. DOI：10.1016/j.jtcvs.2017.05.046.

[32] 李杰，马跃文，康楠，等. 体外放散式冲击波促进脑梗死大鼠海马区神经干细胞增殖并抑制 miR-124 的表达[J]. 中国组织工程研究，2021，25（31）：4981-4987.

[33] TANG S L，HUANG Q H，WU L G，et al. MiR-124 regulates osteoblast differentiation through GSK-3β in ankylosing spondylitis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci，2018，22（20）：6616-6624. DOI：10.26355/eurrev_201810_16136.

[34] WONG T C，FUNG J Y，PANG H H，et al. Analysis of survival benefits of living versus deceased donor liver transplant in high model for end-stage liver disease and hepatorenal syndrome[J]. Hepatology，2021，73（6）：2441-2454. DOI：10.1002/hep.31584.

[35] JUHASZOVA M，ZOROV D B，KIM S H，et al. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Clin Invest，2004，113（11）：1535-1549. DOI：10.1172/JCI19906.

[36] ZHOU L J，MO Y B，BU X，et al. Erinacine facilitates the opening of the mitochondrial permeability transition pore through the inhibition of the PI3K/Akt/GSK-3β signaling pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem，2018，50（3）：851-867. DOI：10.1159/000494472.

[37] PÉREZ M J，QUINTANILLA R A. Development or disease：duality of the mitochondrial permeability transition pore[J]. Dev Biol，2017，426（1）：1-7. DOI：10.1016/j.ydbio.2017.04.018.

[38] WANG H J，ZHU J，JIANG L P，et al. Mechanism of Heshouwuyin inhibiting the Cyt c/Apaf-1/Caspase-9/Caspase-3 pathway in spermatogenic cell apoptosis[J]. BMC Complement Med Ther，2020，20（1）：180. DOI：10.1186/s12906-020-02904-9.

[39] JIN Z，GUO P P，LI X Y，et al. Neuroprotective effects of irisin against cerebral ischemia/reperfusion injury via Notch signaling pathway[J]. Biomedecine Pharmacother，2019，120：109452. DOI：10.1016/j.biopha.2019.109452.

[40] 张利达，韩为，高志波，等."通督调神"法针刺联合颈动脉内膜剥脱术治疗颈动脉狭窄：随机对照研究[J]. 中国针灸，2022，42（2）：121-125. DOI：10.13703/j.0255-2930.20210202-k0007.
ZHANG L D，HAN W，GAO Z B，et al. Tongdu Tiaoshen acupuncture combined with carotid endarterectomy for carotid artery stenosis：a randomized controlled trial[J]. Chinese Acupuncture & Moxibustion，2022，42（2）：121-125. DOI：10.13703/j.0255-2930.20210202-k0007.

[41] 罗佛赐，韩为，张利达，等. 通督调神针刺联合西药对短暂性脑缺血发作合并高尿酸血症患者颈动脉斑块的影响[J]. 上海针灸杂志，2021，40（7）：789-794. DOI：10.13460/j.issn.1005-0957.2021.07.0789.

（收稿日期：2022-12-20；修回日期：2023-03-10）
（本文编辑：赵跃翠）

chinaXiv:202303.10317v1